

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 885 904 A1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
23.12.1998 Patentblatt 1998/52

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C07K 14/575, C07K 7/06,  
C07K 14/47, A61K 38/22

(21) Anmeldenummer: 98110629.7

(22) Anmeldetag: 10.06.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstattungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 17.06.1997 DE 19725619

(71) Anmelder:  
FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER  
ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.  
80636 München (DE)

(72) Erfinder:  
• Kapurnioutu, Afroditi  
72074 Tübingen (DE)

• Bernhagen, Jürgen  
72074 Tübingen (DE)  
• Brunner, Herwig  
70569 Stuttgart (DE)

(74) Vertreter:  
Pfenning, Meinig & Partner  
Mozartstrasse 17  
80336 München (DE)

### Bemerkungen:

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll  
eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen  
Angaben enthält.

(54) Peptide als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität sowie  
der Verwendung bei der Alzheimer'schen Krankheit, beim Typ II Diabetes mellitus und bei  
spongiformen Encephalopathien

(57) Die Erfindung betrifft ein Peptid als Agonist  
und/oder Inhibitor der Amyloidbildung, wobei das Peptid  
3 - 15 Aminosäuren aufweist und mindestens die wirk-

same Peptidsequenz GA umfaßt.

Sequenz (20-29) von hIAPP:

S N N F G A I L S S

Sequenz (25-34) von  $\beta$ -AP:

G S N K G A I I G L

Sequenz (110-119) des PrP:

H V A A G A V V G G

Abb. 1: Anordnung der homologen Sequenzen von IAPP,  $\beta$ -AP und dem Prionprotein (PrP). Homologe  
Reste sind unterstrichen; konservative Substitutionen sind in fett.

EP 0 885 904 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Peptide mit 3 - 15 Aminosäuren, die als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und oder Toxizität fungieren und deshalb bei diesbezüglich verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt werden können.

Neue Strategien und Wirkstoffe zur Therapie und Diagnose der o.g. amyloiden Krankheiten sind weltweit stark umforscht. Eine Möglichkeit zur Behandlung dieser Krankheiten mit Medikamenten/Pharmazeutika gibt es jedoch noch nicht. Der vorherrschenden Lehrmeinung nach sind bestimmte, für jede Krankheit spezifische amyloide Proteine durch ihre Amyloidogenese oder Aggregation ursächlich verantwortlich für das Entstehen der amyloiden Krankheiten. Der Mechanismus zur Amyloidogenese und dem damit zusammenhängenden Zelltod (Zytotoxizität) bei diesen Krankheiten ist jedoch weitgehend unbekannt und entsprechende hochspezifische Inhibitoren sind daher noch nicht identifiziert worden. Pharmazeutika zur Behandlung der amyloiden Krankheiten auf der Basis solcher Inhibitoren wurden also ebenfalls noch nicht entwickelt.

Ebenso haben die durch die Amyloidbildung (Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, den sogenannten amyloiden Strukturen) verursachten proteinchemischen, technisch-analytischen Probleme bisher keine Analytik der Amyloidbildung erlaubt. Das hat dazu beigetragen, daß der Mechanismus der Amyloidbildung noch weitgehend unaufgeklärt ist. Auf der Amyloidbildungsanalyse aufbauende diagnostische Verfahren (schnelle in vitro-Tests zur Bewertung von Menge, Zeitablauf und Qualität der amyloiden Strukturen) existieren daher bei den genannten Krankheiten ebenfalls noch nicht. Zum Beispiel kann eine Diagnose bei der Alzheimer'schen nur symptomatisch (anstiegende Vergeßlichkeit oder ähnliches) oder post mortem durchgeführt werden. es können z.B. keine zuverlässigen Bluttests zu Lebzeiten der Patienten durchgeführt werden.

Ausgehend hiervon ist es deshalb die Aufgabe der Erfindung, geeignete Peptide vorzuschlagen, die als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität fungieren können.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Die Unteransprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf. Die Verwendung der Peptide ist in den Ansprüchen 7 bis 9 angegeben.

Erfindungsgemäß werden danach Peptide mit 3 - 15 Aminosäuren vorgeschlagen, die mindestens die wirksame Sequenz GA enthalten. Es hat sich gezeigt, daß diese Peptidmoleküle als Inhibitoren und/oder Agonisten derjenigen amyloiden Peptide/Proteine fungieren, welche die amyloiden Krankheiten Alzheimer'sche Krankheit, Typ II Diabetes mellitus und Spongiforme Encephalopathien (z.B. Creutzfeld-Jacob-Krankheit, Scrapie Krankheit, BSE) verursachen. Die erfindungsgemäßen Peptidmoleküle sind in der Lage, die Amyloidogenese oder Aggregation der amyloiden Peptide/Proteine  $\beta$ -Amyloides Peptid oder  $\beta$ -AP (bei der Alzheimer'schen Krankheit), Amylin/IAPP (beim Typ II Diabetes mellitus) und Prion-Protein (bei den spongiformen Encephalopathien) zu hemmen. Durch die erreichte Inhibition der Amyloidogenese der krankheitsverursachenden Peptide/Proteine wird auch die durch aggregiertes  $\beta$ -AP, Amylin/IAPP oder Prion-Protein verursachte zytotoxische Wirkung auf Gewebszellen inhibiert.

Die Erfindung bietet folgende Vorteile gegenüber dem Stand der Technik:

- Einfache Chemosynthese in hoher Reinheit und Ausbeute nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese (die hier beschriebenen Peptide sind i.d.R. kürzer als die bisher beschriebenen potentiellen Inhibitoren und bestehen aus nur einer Art Chemischer Bausteine [= Aminosäuren].
- Hohe biologische Stabilität, die durch den einfachen chemischen Einbau unnatürlicher Aminosäuren noch erhöht werden kann.
- Breite biologische und damit potentiell therapeutische Anwendbarkeit (der hohe Homologiegrad zwischen den entsprechenden Sequenzen der amyloidbildenden Peptide/Proteine ermöglicht den überlappenden Einsatz der Inhibitoren in allen drei Krankheiten.
- Geringe Nebenwirkungen und geringe Antigenizität beim Einsatz als Therapeutikum (die Peptide weisen aufgrund ihrer geringen Größe eine kleine Tendenz zur Induktion von Immunreaktionen im Patienten auf; andere in der Literatur beschriebene Inhibitor-kandidaten (siehe oben Antikörper oder höhermolekulare Serumkomponenten und sind ca. 200-300 mal größer als die hier beschriebenen Peptide).
- Hohe biologische Aktivität in vitro und damit hohe vorhersagbare biologische Aktivität in vivo.
- Damit hohe Vorhersagbarkeit einer therapeutischen Anwendung.

Es hat sich gezeigt, daß für die drei eingangs beschriebenen Anwendungsgebiete jeweils unterschiedliche Peptide besonders geeignet sind, die jedoch alle untereinander Homologie aufweisen (Abb. 1). Nachfolgend werden die einze-

len Peptide für die drei Gruppen näher erläutert.

Die geeignete Peptidsequenz, welche für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von IAPP ausreichend ist, ist die Sequenz FGAIL (Einbuchstabencode), welche die Aminosäurereste 23 - 27 von IAPP umfaßt. Eine Verlängerung dieser Sequenz in Richtung des N-Terminus von IAPP ergibt gleichfalls kleine (< 10 Aminosäurereste) Peptidfragmente, welche Fibrillen (eine geordnete Aggregatstruktur, die typisch für amyloide Krankheiten ist) bilden können und Zytotoxizität aufweisen. Zur spontanen Aggregation, d.h. Herstellung einer übergesättigten Peptidlösung dieser Peptide, wird eine 100 - 100fach höhere Konzentration, verglichen mit IAPP, benötigt. Diese Sequenzen wurden als kleinmolekulare Inhibitoren der Amyloidbildung von IAPP erfolgreich eingesetzt, da sie die kürzeste und für die Aggregation von IAPP notwendige Peptidsequenz enthalten. Diesem Effekt liegt der Aggregationsmechanismus von IAPP und gleichermaßen anderer amyloidbildender Peptide (wie  $\beta$ -AP und dem Prion-Protein) zugrunde. Dabei erfolgt die Aggregation und Amyloidbildung durch eine intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt-Bildung, wofür intermolekulare (zwischen den Molekülketten) Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten bestimmter Aminosäurereste notwendig sind. Diese  $\beta$ -Faltblatt-Struktur führt zu einer nicht-kovalenten Bindung zwischen zunächst zwei und anschließend mehreren IAPP-Molekülen, welche daraufhin unlösliche Aggregate/Amyloid-Strukturen bilden. Der Wirkungsmechanismus (Inhibition) der erfindungsgemäßen Peptide besteht darin, die aggregationsfördernden, intermolekularen Wechselwirkungen zwischen zwei IAPP-Molekülen zu unterbinden. Letzteres wird dadurch erreicht, daß die Peptide selber diese Wechselwirkungen mit IAPP eingehen. Somit entsteht eine Konkurrenz (Agonismus) zwischen IAPP und den Peptiden um die freien "Bindungsstellen" von IAPP. Auf der agonistischen Wirkung dieser Peptide beruht auch ihr potentieller Einsatz als Krankheits-Diagnostika. Dadurch, daß die lösliche Form der Peptide und bzw. niedrige Konzentrationen (micromolar) weder aggregieren noch Zytotoxizität aufweisen, wird ihr Einsatz als Inhibitoren und Typ II-Diabetes-Diagnostika ermöglicht.

Folgende Peptidsequenzen wurden synthetisiert und als Inhibitoren der Amyloidbildung und Zytotoxizität von IAPP eingesetzt: GAIL, FGAIL, NFGAIL, NNFGAIL, SNNFGAIL, NGGAILSS, SNNFGAILSS, wobei die einzelnen Buchstaben für Aminosäuren nach dem Einbuchstabencode stehen. Darüberhinaus werden H-Moleküle der Amidbindungen der obigen Peptidsequenzen durch eine Methyl-Gruppe ersetzt, um die durch  $\beta$ -Faltblattbildung induzierte Aggregation der Peptide zu unterbinden. Die Methyl-Gruppen wurden bei jeder zweiten Amidbindung eingeführt, jedoch variierte die Zahl der eingeführten Methyl-Gruppierungen. Die hergestellten Peptidanaloga enthalten eine Zahl von N-methylsubstituierten Amidbindungen, welche sich zwischen einer und der Hälfte der vorhandenen Amidbindungen pro Molekül erstreckt. Dem Design dieser Klasse von Aggregationsinhibitoren liegt die Überlegung zugrunde, daß durch die Einführung der Methylgruppe bei jeder zweiten Amidbindung die Dimerisierung oder die nicht-kovalente Bindung der kleinmolekularen Peptidsequenzen an IAPP nicht beeinträchtigt, die sonst nachfolgende nicht-kovalente Expandierung der  $\beta$ -Faltblattstrukturen, welche zur Aggregation führt, jedoch weitgehend ausgeschaltet wird. Im folgenden werden repräsentative Beispiele dieser Substanzklasse, welche als Aggregationsinhibitoren von IAPP erfolgreich eingesetzt wurden, benannt: (N-Me)-GA-(N-Me)IL, F(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NNF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, SNNF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NF(N-Me)-GA-(N-Me)ILSS, SNNF(N-Me)-GA-(N-Me)-GA-(N-Me)IL, G(N-Me)-Al(N-Me)-L, FG(N-Me)-Al(N-Me)-L, NFG(N-Me)-Al(N-Me)-L, NNFG(N-Me)-Al(N-Me)-L, SNNFG(N-Me)-Al(N-Me)-L, NFG(N-Me)-Al(N-Me)-LSS, SNNFG(N-Me)-Al(N-Me)-LSS, FGA(N-Me)-IL, NFGA(N-Me)-IL, NNFGA(N-Me)-IL, SNNFGA(N-Me)-IL, NFGA(N-Me)-ILSS, SN(N-Me)-NFGAILSS, N-Me)-SN(N-Me)-NFGAILSS, (N-Me)-SN(N-Me)-NF(N-Me)-GAILSS etc.

Bei dem geeigneten Peptid, welches sich für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von  $\beta$ -AP einsetzen läßt, handelt es sich um Sequenzbereiche von  $\beta$ -AP, welche sich zwischen den Aminosäuren 25 und 34 befinden. In Analogie zur Sequenz 23 - 27 von IAPP wurde in  $\beta$ -AP die Sequenz 28 - 32 (KGAIL) als die geeignete Sequenz, welche für die Amyloidbildung und Neurotoxizität des Gesamtmoleküls  $\beta$ -AP ausreicht, gefunden. Aus den gleichen Überlegungen wie im Falle der IAPP-Amyloidbildungsinhibitoren wurden die folgenden zum IAPP homologen  $\beta$ -AP Sequenzen synthetisiert und als Inhibitoren der  $\beta$ -AP-Amyloidbildung und -Neurotoxizität eingesetzt: GAIL, KGAIL, NKGAIL, SNKGAIL, GSNKGAIL, NKGAILGL, GSNKGAILGL. Fernerhin, wie oben beschrieben, wurden auch Analoga mit substituierten Amidbindungen hergestellt. Die Strukturen dieser Analoga wurden nach dem gleichen Prinzip wie die N-methylierten Inhibitoren der IAPP-Amyloidbildung (siehe oben) designed. Im folgenden werden repräsentative Beispiele dieser Substanzklasse aufgelistet: (N-Me)-GA-(N-Me)IL, K(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NK(N-Me)-GA-(N-Me)-IL, SNK(N-Me)-GA-(N-Me)IL, GSNK(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NK(N-Me)-GA-(N-Me)IIGL, GSNK(N-Me)-GA-(N-Me)IL, G(N-Me)-Al(N-Me)-I, KG(N-Me)-Al(N-Me)-I, NKG(N-Me)-Al(N-Me)-I, SNKG(N-Me)-Al(N-Me)-I, GSNKG(N-Me)-Al(N-Me)-I, NKG(N-Me)-Al(N-Me)-IGL, GSNKG(N-Me)-Al(N-Me)-IGL, KGA(N-Me)-II, NKGA(N-Me)-II, SNKGA(N-Me)-II, GSNKGA(N-Me)-IIGL, GS(N-Me)-NKGAILGL, (N-Me)-GS(N-Me)-NK(N-Me)-GAILGL etc.

Die geeignetste Sequenz, welche für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von PrP ausreichend ist, ist AGAVV. Es handelt sich hier um eine Teilsequenz aus der Sequenz 110 - 119 PrP. Weitere Sequenzen, die als Aggregations und Toxizitätsinhibitoren von PrP Verwendung finden, sind: GAIL, AAGAVV, VYVGAVV, HVAAGAVV, AAGAVVGG, HVAA-GAVVGG. Auch die entsprechenden N-methylierten Peptidsequenzen - analog zu den IAPP-Derivaten (siehe oben) - sind als Aggregations- und Toxizitätsinhibitoren geeignet. Im folgenden werden einige repräsentative Beispiele der N-methylierten Analoga aufgeführt. (N-Me)-GA-(N-Me)VV, A(N-Me)-GA-(N-Me)VV, AA(N-Me)-GA-(N-Me)VV, AAGA(N-

Me)-VVG, HV(N-Me)-AAGAVVG, (N-Me)-HV(N-Me)-AAGAVVG, (N-Me)-HV(N-Me)-AA(N-Me)-GAVVG etc.

Bei der Erfindung handelt es sich somit um peptidische Moleküle, welche als Grundstrukturen (Templatmoleküle) zur Inhibition und Analyse der Amyloidbildung und Zytotoxizität bei amyloiden Krankheiten verwendet werden können. Dabei wirken diese Peptide auf die für die amyloiden Krankheiten verantwortlichen Moleküle (ihrerseits amyloidbildende Peptide und Proteine) ein. Die Peptide sind somit entweder selber Inhibitoren oder Agonisten der Amyloidbildung und Zytotoxizität oder können als Template für die Identifizierung und Herstellung weiterer Inhibitoren und Agonisten dienen oder können als molekulare Werkzeuge bei der Analyse eingesetzt werden.

Diese Peptide finden Anwendung als pharmazeutische Inhibitoren der Amyloidbildung und Zytotoxizität oder als molekulare Werkzeuge zur Analyse der Amyloidbildung und Zytotoxizität bei amyloiden Krankheiten. Somit handelt es sich um potentielle Pharmaka und Analytika zur Behandlung und Diagnose folgender auch beim Menschen vorkommender Krankheiten:

Alzheimer'sche Krankheit,  
Typ II Diabetes mellitus,  
Spongiforme Encephalopathien (z.B. Creutzfeld-Jacob-Krankheit, Scrapie-Krankheit, BSE).

Die diagnostische Anwendung umfaßt zwei Aspekte:

- Verwendung als molekulares Werkzeug zur weiteren Erforschung des Mechanismus der Amyloidbildung bei diesen Krankheiten (Einsatz in Forschungslabors und F&E-Labors).
- Potentielle Verwendung als Reagenz zur Diagnostik amyloider Krankheiten bzw. der Vorhersage solcher Krankheiten (Diagnostika-Markt).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

NFGAIL: Herstellung, Charakterisierung, Aggregation, Testung der Fibrillenbildung, Testung der Zytotoxizität, Testung der inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation von IAPP.

#### Herstellung und Charakterisierung

NFGAIL wurde nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Es wurde der Wang-Anker verwendet, und die Fmoc/Bu-Synthesestrategie eingesetzt. Für einen 1 mM Ansatz wurden 4 mmol der geschützten Aminosäuren 4 mmol TBTU und 6 mmol DIEA in DMF pro Kupplungsschritt verwendet. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppen (Fmoc) erfolgte mittels 25 % Piperidin in DMF und für die Abspaltung des Peptides vom Anker unter gleichzeitiger Abspaltung der permanenten Schutzgruppen der Seitenketten wurde 95 % TFA verwendet (Reaktionszeit 2 h). Das Rohprodukt wurde durch präparative RP-HPLC gereinigt und durch FAB-MS und Aminosäureanalyse charakterisiert.

#### Aggregation und Testung der Fibrillenbildung

Die Aggregationseigenschaften wurden in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4 getestet. Zunächst wurde eine hochkonzentrierte (125 - 250 mM) Stammlösung des Peptides in DMSO hergestellt. Aus dieser Lösung wurde das Peptid direkt in die Aggregationslösung unter mildern Rühren pipettiert. Eine 5 mM Peptidlösung aggregierte spontan und wies somit keine "Aggregations-Lag-Time" auf, dagegen hat sich Aggregat erst nach 9 1/2 h gebildet aus einer Lösung von 3,75 mM NFGAIL (Aggregations-Lag-Time: 9 1/2 h) (Abb. 2). Fernerhin erfolgte sofortige Aggregation, wenn vorgefertigte NFGAIL Fibrillen (Nukleationskeime) zu der 3,75 mM Lösung addiert wurden (Fibrillenkonzentration 0,375 mM). Somit wurde gezeigt, daß die Aggregation dieser Peptide nach dem sogenannten "nukleations-abhängigen Polymerisationsmechanismus" verläuft. Letzteres ist von großer Bedeutung, da in der Literatur die Meinung herrscht, daß die Amyloidbildung (in vitro) durch diesen Mechanismus verlaufen soll. Nach vollständiger Aggregation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation isoliert und durch Elektronen- und Polarisationsmikroskopie nach Kongorot Färbung untersucht. Dadurch wurde die fibrilläre und amyloide Struktur des Aggregats bestätigt (Abb. 3).

#### Testung der Zytotoxizität

Suspensionen der Peptidaggregate (hergestellt wie oben beschrieben) wurden mittels einer Rat Insulinoma (RIN5mf) und einer humanen Astrogloma-Zelllinie (HTB-14) auf Toxizität getestet. Die frisch gelösten Peptide wurden ebenso auf Zytotoxizität getestet. Somit konnte gezeigt werden, daß die aggregierte Form von NFGAIL zytotoxisch ist, wobei die lösliche Form des Peptides keine Toxizität aufwies (Abb. 4).

EP 0 885 904 A1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Fraunhofer Gesellschaft zur Foerderung der  
angewandten Forschung e.V.
- (B) STRASSE: Leonrodstr. 54
- (C) ORT: Muenchen
- (D) BUNDESLAND: Freistaat Bayern
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 80636

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Peptide als Agonisten und/oder Inhibitoren  
der Amyloidbildung und Zytotoxizitt sowie der Verwendung  
bei der Alzheimerschen Krankheit, beim Typ II Diabetes  
mellitus und bei spongiformen Encephalopathie

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTR GER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: EP 98110629.7

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19725619.8
- (B) ANMELETAG: 17-JUN-1997

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 4 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (iv) ANTISENSE: NEIN

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Ala Ile Leu  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 5 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

EP 0 885 904 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 7 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

EP 0 885 904 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 10 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 4 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Ala Ile Ile  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 5 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

EP 0 885 904 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 7 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5



EP 0 885 904 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 10 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 5 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Ala Gly Ala Val Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

EP 0 885 904 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 7 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Val Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 8 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

His Val Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 8 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) L NGE: 10 Aminos,uren
- (B) ART: Aminos,ure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

His Val Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly  
1 5 10

Patentansprüche

1. Peptid als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Peptid 3 - 15 Aminosäuren aufweist und mindestens die wirksame Peptidsequenz GA umfaßt.
2. Peptid nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß es maximal 10 Aminosäuren aufweist.
3. Peptid nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß es die wirksame Peptidsequenz GAI umfaßt.
4. Peptid nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen GAIL, FGAIL, NFGAIL, NNFGAIL,  
SNNFGAIL, NFGAILSS oder SNNFGAILSS gebildet ist.
5. Peptid nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen GAIL, KGAIL, NKGAIL, SNKGAIL,  
GSNKGAIL, NKGAILGL oder GSNKGAILGL gebildet ist.
6. Peptid nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen AGAVV, AAGAVV, VYYGAVV, HVAAGAVV,  
AAGAVVGG oder HVAAGAVVGG gebildet ist.
7. Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Wasserstoffmolekül der Amidbindung in der Sequenz durch eine  
Methylgruppe ersetzt ist.
8. Peptid nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß jedes zweite Wasserstoffmolekül durch eine Methylgruppe ersetzt ist.
9. Verwendung eines Peptids nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4,  
zur Herstellung eines Arzneimittels als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität bei Typ  
II Diabetes mellitus.

**EP 0 885 904 A1**

10. Verwendung eines Peptids nach mindestens einem der Ansprüche 1, 3 und 5,  
zur Herstellung eines Arzneimittels als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder der Zytotoxizität bei  
der Alzheimer'schen Krankheit.

5 11. Verwendung der Peptide nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2 und 6,  
als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität bei spongiformen Encephalopathien.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Sequenz (20-29) von hIAPP:	S N <u>N</u> F <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> L S S
Sequenz (25-34) von $\beta$ -AP:	G S <u>N</u> K <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> I <u>G</u> L
Sequenz (110-119) des PrP:	H V A A <u>G</u> <u>A</u> V V <u>G</u> G

Abb. 1: Anordnung der homologen Sequenzen von IAPP,  $\beta$ -AP und dem Prionprotein (PrP). Homologe Reste sind unterstrichen; konservative Substitutionen sind in fett.

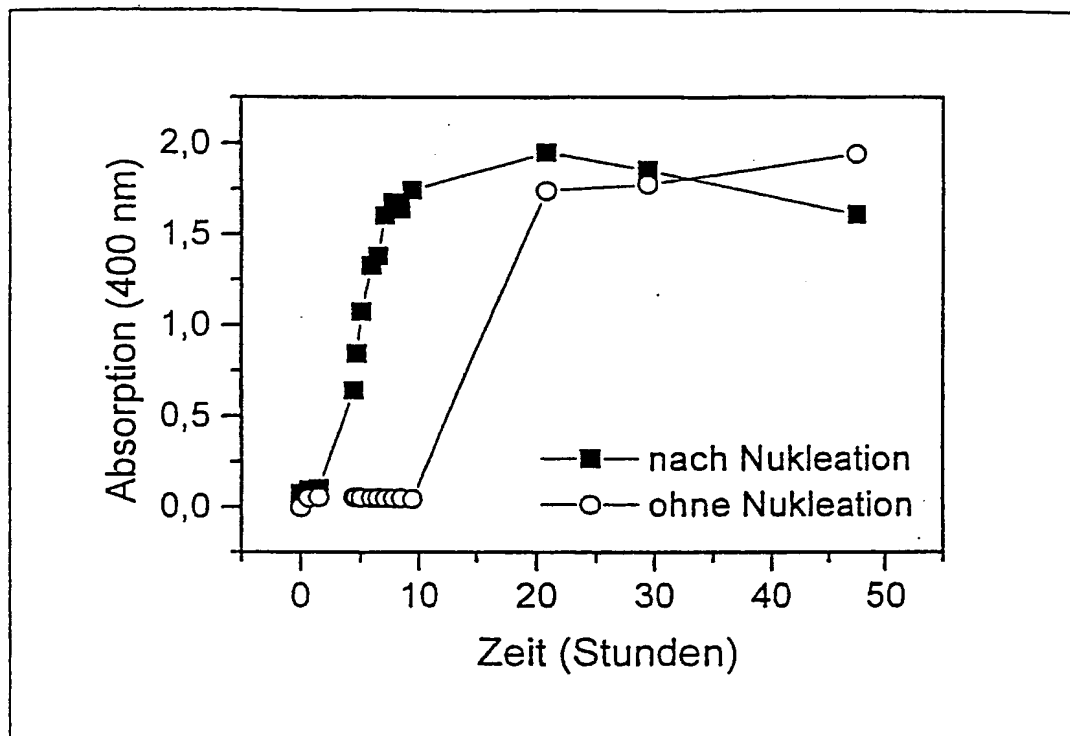


Abb. 2: Aggregation von NFGAIL. Dabei wurde die Absorption bei 400 nm als Indikator für die Fibrillenbildung (Lichtstreuung an partikulären Bestandteilen) in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.



Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von NFGAIL-Aggregaten.

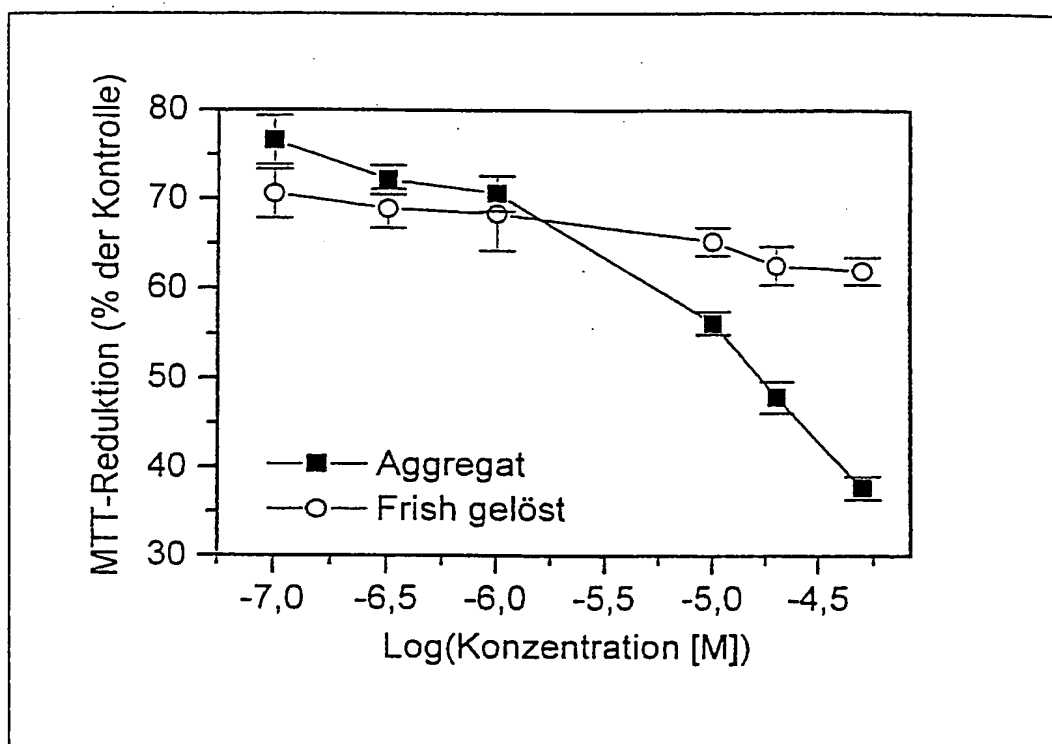


Abb. 4: Testung der Zytotoxizität von NFGAIL. Der Umsatz des Farbstoffs MTT wurde als Maß für die Zellvitalität nach bekannten Protokollen in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz gemessen.





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
Übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 98 11 0629

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	WO 96 39834 A (UNIV NEW YORK) 19. Dezember 1996 * Seite 8, letzter Absatz * * Seite 14, Absatz 1 * SEQ.ID.23 * Seite 16, letzter Absatz; Ansprüche *	1, 2, 6, 9-11	C07K14/575 C07K7/06 C07K14/47 A61K38/22
X	EP 0 289 287 A (AMYLIN CORP) 2. November 1988 * Seite 2, Zeile 62 * * Seite 3, Zeile 9; Ansprüche 10, 11, 30 *	1-4, 9-11	
X	EP 0 309 100 A (AMYLIN CORP) 29. März 1989 * Seite 2, Zeile 45 - letzte Zeile; Anspruch 1 *	1-4, 9-11	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C07K A61K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Obwohl der Anspruch 11 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		29. September 1998	
		Prüfer	
		Cervigni, S	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03/92 (Pct/C99)



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER  
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 98 11 0629

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
X	K. GANOWIAK ET AL: "Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., Bd. 199, Nr. 1, 1994, Seiten 306-312, XP002077761 ORLANDO, FL US * Seite 307, Absatz 3 *	1-4	
X	WO 96 07425 A (UNIV WASHINGTON ; PERLMUTTER DAVID H (US)) 14. März 1996 * Seite 8, Absatz 1 *	1-3,5, 9-11	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)